

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 01207236 A

(43) Date of publication of application: 21.08.89

(51) Int. Cl

A61K 31/70
// C07H 13/06

(21) Application number: 63032149

(22) Date of filing: 15.02.88

(71) Applicant: SAWAI SEIYAKU KK

(72) Inventor: KATO TAKAYOSHI
NATSUHARA YAYOI
OKA SHIRO
YANO IKUYA

(54) TUMOR NECROSIS FACTOR INDUCER

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain a tumor necrosis factor inducer of low toxicity, which contains fatty acid esters of monosaccharides and disaccharides, as active ingredients, and acts as a primary inducer in the induction of the tumor necrosis factor.

CONSTITUTION: The inducer contains, as an active

ingredient, a fatty acid ester of monosaccharide such as glucose, fructose or mannose or disaccharide such as sucrose or trehalose, where trehalose dimycolate is excluded. The fatty acid ester is preferably mycolic acid ester, for example, glucose monomycolate, mannose monomycolate or sucrose dimycolate. These esters significantly induces TNF in combination with a secondary inducer such as liposaccharide.

COPYRIGHT: (C)1989,JPO&Japio

BEST AVAILABLE COPY

⑯ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A) 平1-207236

⑬ Int. Cl.⁴ 識別記号 庁内整理番号 ⑭ 公開 平成1年(1989)8月21日
A 61 K 31/70 ADU 7431-4C
// C 07 H 13/06 7417-4C
審査請求 未請求 請求項の数 2 (全5頁)

⑮ 発明の名称 腫瘍壞死因子誘起剤

⑯ 特 願 昭63-32149

⑰ 出 願 昭63(1988)2月15日

⑱ 発明者 加藤 敬香 兵庫県西宮市甲陽園東山町7-36

⑲ 発明者 夏原 やよい 大阪府大阪市都島区友渕町1丁目3番15-404号

⑳ 発明者 岡 史朗 大阪府高石市東羽衣5-7-4

㉑ 発明者 矢野 郁也 大阪府箕面市箕面4-16-11

㉒ 出願人 沢井製薬株式会社 大阪府大阪市旭区赤川1丁目4番25号

㉓ 代理人 弁理士 高島 一

明細書

1. 発明の名称

腫瘍壞死因子誘起剤

2. 特許請求の範囲

(1) 単糖類または二糖類の脂肪酸エステル（ただし、トレハロースジミコレートは除く）を有効成分とする腫瘍壞死因子誘起剤。

(2) 脂肪酸エステルを構成する脂肪酸残基がミコール酸残基である請求項(1)記載の腫瘍壞死因子誘起剤。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は単糖類または二糖類のモノー、ジーまたはトリーエステルを有効成分とする腫瘍壞死因子(Tumor Necrosis Factor, 以下TNFと略する)誘起剤に関する。特にTNFを誘起するための第一次誘起剤として有用であるTNF誘起剤に関する。

〔従来技術・発明が解決しようとする課題〕

1975年Oild等は正常細胞に何ら障害を与

えず癌細胞のみを特異的に攻撃する糖蛋白質、即ち腫瘍壞死因子(TNF)を報告した(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 3666 (1975))。

これによれば、BCG生菌などの第一次誘起剤をマウスの静脈内に投与し、1~2週間後にリボ多糖体(以下LPSと略する)などの第二次誘起剤を投与すると、血漿中にTNFが誘起されることが報告されている。またBCG生菌の代わりにホルマリンで死菌化した*Propionibacterium acnes*を用いた場合も上記と同様に操作するとTNFの誘起が認められることが報告されている。

しかしながら、BCG生菌あるいは死菌化した*Propionibacterium acnes*にあっては、その作用を発現する物質以外の物質をも含有し、その生物学的活性に多様性、不均一性が見られ、また作用を発現する物質は明確な構造のものではないので、合成等の手段にて当該物質を製造することができない。

一方、構造決定された化合物ではその物理化学的性質が均一であること、量産が可能であること、

BEST AVAILABLE COPY

特開平1-207236 (2)

使用に際して同一の作用・効果が期待できることなどから、化学構造の決定された化合物を活性成分とするTNF誘起剤が待望されているのが実情である。

従って、本発明の目的はBCC生菌あるいは死菌化したPropionibacterium acnesなどの第一次誘起剤に代わるTNF誘起剤であって、構造決定された化合物を有効成分とするTNF誘起剤を提供することである。

〔課題を解決するための手段〕

本発明者等はかかる目的を達成するために、調査研究を行った結果、单糖類または二糖類の脂肪酸エステル（但し、トレハロース ジミコレートは除く）、特に脂肪酸エステルを構成する脂肪酸残基がミコール酸残基である上記脂肪酸エステルが所望とするTNF誘起活性を持つことを見出し、本発明を完成したものである。

即ち、本発明は单糖類または二糖類の脂肪酸エステル（但し、トレハロース ジミコレートは除く）を有効成分とする體壘壞死因子誘起剤である。

式(1)に関して、アルキル基は直鎖状または分岐状のいずれでもよく、また不飽和結合（好ましくは二重結合）を有していてもよい。式(1)で表されるミコール酸残基における総炭素数は好ましくは20～90程度である。

R'で表されるアルキル基は好ましくは次の如きものである。即ち、炭素数が8～26の直鎖状または分岐状で不飽和結合（好ましくは二重結合）を0～2程度有するものである。また、R"で表されるアルキル基は好ましくは次の如きものである。即ち、炭素数が20～60の直鎖状または分岐状で不飽和結合（好ましくは二重結合）を1～9程度有するものである。

なお、脂肪酸エステルはモノエステルのみならずジエステル、トリエステルのいずれでもよい。

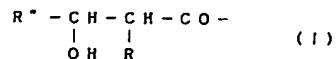
本発明で用いられる单糖類または二糖類の脂肪酸エステル、特にミコール酸エステルとしては、例えば次の化合物が例示される：

ブドウ糖のモノミコール酸エステル、
マンノースのモノミコール酸エステル、

本明細書において、单糖類とはブドウ糖、果糖、マンノースのようにC_nH_{2n}O_n (n = 3～7)で表されるアルドースまたはケトースを示し、直鎖状、環状構造のいずれをも包含する概念である。また、二糖類とはショ糖やトレハロースのように、单糖がグリコシド結合によって脱水縮合したものと示し、構成する糖には特に制限はない。

本発明の有効成分である脂肪酸エステルは、好ましくは抗酸菌から抽出されるものであり、特に好ましくは、その脂肪酸残基がミコール酸残基である脂肪酸エステルである。

ミコール酸残基とは式



(式中、R'およびR"はそれぞれ不飽和結合を有していてもよいアルキル基を表す。即ち、本発明にいうアルキル基は不飽和結合を有するもののも含む概念であり、通常のアルキル基の概念より広範囲である。)

で表されるものである。

ショ糖のモノミコール酸エステル、
ショ糖のジミコール酸エステル、
トレハロースのモノミコール酸エステルおよび
トレハロースのトリミコール酸エステル等が例示される。

本発明の有効成分である脂肪酸エステルは一般的には既知の化合物であるが、ミコール酸エステルについてその一般的製法を例示すれば次の通りである。

即ち、たとえばミコバクテリウム属、ノカルディア属、ロドコッカス属、ブルドナ属、コリネバクテリウム属等の抗酸菌に属する菌株より公知の抽出操作により単離することができる。培養方法としては特公昭62-131号公報、特開昭54-28830号公報、WO87/05606号公報に開示の方法などが挙げられる。

前記ミコール酸エステルを含む脂肪酸エステルは合成によつても容易に製造することができるが、合成によって製造された化合物は单一ないしは活性成分のみの組成であり、好ましい態様である。

BEST AVAILABLE COPY

特開平1-207236(3)

【作用・効果】

本発明で使用される脂肪酸エステルは、TNPの誘起に関して第一次誘起剤としての作用を有するものであり、LPSなどの第二次誘起剤と併用することによって有為にTNPを誘起するものである。

本発明で使用される脂肪酸エステルの毒性については種々報告されており、その毒性が極めて少ないとされている。

本発明の有効成分である脂肪酸エステルは、慣用の製剤化手段によって任意の形態に製剤化して本発明のTNP誘起剤を調製することができる。

かかるTNP誘起剤は任意の所要の医薬上許容される添加剤（例えば、粗体、賦形剤等）を使用して常套手段によって調製される。具体的な製剤としては、例えば経口剤（例えば錠剤、カプセル剤、散剤、リボソーム等）、注射剤（リボソーム、乳濁性注射剤（例えば有機酸、有機塩基、界面活性剤、水溶性高分子、水溶性有機溶剤等を使用する乳化剤）、生理食塩水等を使用した懸濁性注射

剤）等が例示される。

本発明の有効成分である脂肪酸エステルのヒトへの投与量は剤型、投与ルート、患者の重篤度、薬物に対する許容度等により異なるが、通常成人あたり、10mg～2000mg、好ましくは500mg～1000mgの範囲で、これを1回または数回に分けて投与するのがよい。

本発明のTNP誘起剤投与後、1日～3日後にLPSなどの第二次誘起剤を、例えば従来の投与量と同程度投与することによってTNPが誘起される。

【試験例】

試験例1 (L-929細胞に対する細胞障害性)

(1) 一群8匹のICR系5週令雄性マウス（静動協）に3.2%プロイント不完全アジュバントを含有する水中油中水型エマルジョンに懸濁した各々の脂肪酸エステルを30μg/マウスずつ隔日に10回尾静脈に投与した。

対照として脂肪酸エステルを含まない水中油中水型エマルジョンを0.2ml/マウスずつ同様に投

与した。

投与終了後1～3日後に、大腸菌 (*E. coli*)由來のLPS 100μg/マウスを尾静脈内に投与し、その2時間後にマウスから全採血し、常法により血清 (TNPを含む) を分離した。

(2) 10%ウシ胎仔血清を添加したイーグルMEM培地に 3×10^3 個/mlのL-929細胞（線維芽細胞）を懸濁し、100μlずつ96穴のマイクロプレートに分注し、5%CO₂中37℃で培養した。約24時間後に、イーグルMEM培地で段階希釈（2⁴～2¹¹倍希釈）した(1)のマウス血清50μlおよび1μg/mlアクチノマイシンD50μl（最終濃度0.25μg/ml）を分注し、培養を続けた。18時間後、培養上清を吸引除去し、プレート上の細胞をクリスタルバイオレットで染色した後、生細胞中に取り込まれた色素を3.3%酢酸で抽出し、550nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。その吸光値から下記式を用いてL-929細胞障害性（%）を求めた。対照として血清無添加群をおいた。

$$\frac{(\text{対照(血清無添加)} - (\text{サンプルの吸光度}))}{(\text{対照(血清無添加)} - \text{吸光度})} \times 100$$

その結果を第1図に示す。第1図において縦軸はL-929細胞障害性（%）を、横軸に希釈倍率のlog₂対数値をとった。このグラフから50%細胞障害性の数値を読み取り、近似的10進数値で表した。表1にその数値を示す。

なお、下記表中、*Nocardia rubra*はNr、グルコース・ミコレートはGM、マンノース・ミコレートはMM、*Cordona aurantiaca*はCaおよびトレハロース・トリミコレートはTTMを意味する。

表 1

| 第一次 誘起剤 | 第二次 誘起剤 | 50% L-929 細胞障害 示す希釈倍率 |
|-----------------------|------------|--------------------------|
| — | LPS | 細胞障害作用なし |
| Nr由来GM ¹¹ | LPS | 約2.5×10 ³ |
| Nr由来MM ¹¹ | LPS | 約1×10 ⁴ |
| Ca由来TTM ¹¹ | LPS | 約1×10 ⁵ |

¹¹:Journal of Pharmacobio-Dynamics, 10, 113-

BEST AVAILABLE COPY

特開平1-207236 (4)

123 (1987)

" : PEGS LETTERS, 203(2), 239-242 (1986)

(実施例)

実施例 1

卵黄ホスファチジルコリン (1.5 μ mole) とトレハロース トリミコレート (1 mg) をクロロホルムに溶解した溶液をナス型コルベンに入れ、2.5 ~ 3.0 ℃の水浴中で波状下にクロロホルムを留去し、コルベン内壁に薄膜を形成させた。このコルベンに pH 7.0 リン酸緩衝生理食塩水 (1 ml) を入れ、内壁の薄膜がはがれるまで振盪した。作製したリポソームをドライアイス・メタノールで凍結し、凍結乾燥機で凍結乾燥を行い、トレハロース トリミコレート含有リポソームの凍結乾燥粉末を得た。

実施例 2

卵黄ホスファチジルコリンのかわりに、大豆ホスファチジルコリンを使用して実施例 1 と同様に操作し、トレハロース トリミコレート含有リポソームの凍結乾燥粉末を得た。

末を得た。

実施例 7

下記处方よりなるリポソームの懸濁性注射剤を常套手段にて製造した。

| | |
|----------------|--------|
| トレハロース トリミコレート | 300 mg |
| 卵黄ホスファチジルコリン | 720 mg |
| 生理食塩水 | 適量 |
| 全量 | 5 ml |

実施例 8

下記处方よりなる非水性溶剤を用いた注射剤を常套手段にて製造した。

| | |
|----------------|--------|
| トレハロース モノミコレート | 100 mg |
| オリーブ油 | 適量 |
| 全量 | 1 ml |

実施例 9

下記成分中、水以外の成分の規定量を取り、40 ℃まで加温しながら攪拌し、均一とする。このもとに精製水を加えて攪拌し、白濁した乳濁性注射液を製造した。

トレハロース トリミコレート 300 mg

実施例 3

卵黄ホスファチジルコリンのかわりに、ジバルミトイルホスファチジルコリンを使用して実施例 1 と同様に操作し、トレハロース トリミコレート含有リポソームの凍結乾燥粉末を得た。

実施例 4

トレハロース トリミコレートのかわりに、グルコース ミコレートを使用して実施例 1 と同様に操作し、グルコース ミコレート含有リポソームの凍結乾燥粉末を得た。

実施例 5

トレハロース トリミコレートのかわりに、マンノース ミコレートを使用して実施例 1 と同様に操作し、マンノース ミコレート含有リポソームの凍結乾燥粉末を得た。

実施例 6

卵黄ホスファチジルコリンとトレハロース トリミコレート溶液にさらにコレステロール 1 mg を加え、以下実施例 1 と同様に操作し、トレハロース トリミコレート含有リポソームの凍結乾燥粉

| | |
|---------------|--------|
| オリーブ油 | 100 mg |
| d L-α-トコフェロール | 50 mg |
| ポリソルベート 80 | 80 mg |
| セスキオレイン酸ソルビタン | 60 mg |
| 精製水 | 適量 |
| 全量 | 5 ml |

4. 図面の簡単な説明

第 1 図は 550 nm における吸光値から各々脂肪酸エステルの J - 929 細胞障害性 (%) を求め、その結果を示すグラフである。

特許出願人 沢井薬業株式会社
代理人 弁理士 高島一

BEST AVAILABLE COPY

特開平1-207236 (5)

第1図

